

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION (WIPO)  
ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE (OMPI)



PCT

(Patent Cooperation Treaty)

34, chemin des Colombettes - 1211 Geneva 20 - Switzerland  
Tel (41-22) 338 9111 - Telex 412 912 ompi ch - Facsimile (41-22) 733 5428

PCT Facsimile (41-22) 740 1435

**Facsimile/Télécopie**

Date : 07 September 2005 (07.09.05) Fax: 03-3588-1397

To : 理創国際特許事務所  
外国部 御担当 幸地 様

From : Yuichiro AIDA

Telephone: (41-22) 338 8994

Email address: yuichiro.aida@wipo.int

Concerns: 国際公開の件について(JP2003/014075)

Number of pages including cover sheet : 1

いつもお世話になっております。

9月1日付ファクシミリにてお問い合わせいただきました当出願の国際公開についてですが、当出願につきましては、指定国が米国のみとなっているため、条約64条(3)(a)(b)の規定により国際公開はされておられません。そのため、国際公開公報が発行されていない代わりに、出願書類一式のコピーを米国及び代理人様あてに送付しております。

以上のような経緯になっておりますので、御理解のほどよろしくお願いします。

Yuichiro AIDA  
PT08  
PCT Examination Section

# PATENT COOPERATION TREATY

PCT

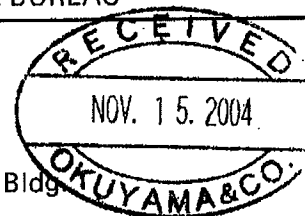
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE  
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL  
APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

OKUYAMA, Shoichi  
8th Floor, Akasaka NOA Bldg  
2-12, Akasaka 3-chome  
Minato-ku, Tokyo 107-0052  
Japan



Date of mailing (day/month/year) 03 November 2004 (03.11.2004)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference 1367			
International application No. PCT/JP2003/014075	International filing date (day/month/year) 04 November 2003 (04.11.2003)	Priority date (day/month/year) 25 April 2003 (25.04.2003)	
Applicant HAYASHIZAKI, Yoshihide et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has **communicated**, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this notice:

US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

None

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

#### 4. TIME LIMITS for filing a demand for international preliminary examination and for entry into national phase

The applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph** be **30 MONTHS** from the priority date, not only in respect of any elected Office if a demand for international preliminary examination is filed before the expiration of **19 months** from the priority date, but also in respect of any designated Office, in the absence of filing of such demand, where Article 22(1) as modified with effect from 1 April 2002 applies in respect of the designated Office. For further details, see PCT Gazette No.44/2001 of 1 November 2001, pages 19926, 19932 and 19934, as well as the PCT Newsletter, October and November 2001 and February 2002 issues.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain designated or elected Offices. For **regular updates on the applicable time limits** (20, 21, 30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the PCT Gazette, the PCT Newsletter and the PCT Applicant's Guide, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

For filing a **demand for international preliminary examination**, see the PCT Applicant's Guide, Volume I/A, Chapter IX. Only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination (at present, all PCT Contracting States are bound by Chapter II.)

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these limits.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer  Yuichiro AIDA (Fax 338 7010)
Facsimile No. (41-22) 338.70.10	Telephone No. (41-22) 338 8994

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日 (04.11.2003) 火曜日 14時58分36秒

0	受理官庁記入欄	PCT/JP 03/14075
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	04.11.03
0-3	(受付印)	PCT International Application 日本国特許庁
0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際 出願願書は、 右記によって作成された。	PCT-EASY Version 2.92 (updated 01.07.2003)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許 協力条約に従って処理されるこ とを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理 官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の書類記号	1367
I	発明の名称	胃癌由来の転移癌細胞の検出方法
II	出願人	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
II-1	この欄に記載した者は	<del>米国のみ (US only)</del> <i>すべての指定国 (all designated states)</i> <span style="float: right;">*RO</span>
II-2	右の指定国についての出願人で ある。	
II-4ja	氏名(姓名)	林崎 良英
II-4en	Name (LAST, First)	HAYASHIZAKI, Yoshihide
II-5ja	あて名:	305-0061 日本国 茨城県 つくば市 稲荷前22-8
II-5en	Address:	22-8, Inarimae Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0061 Japan
II-6	国籍 (国名)	日本国 JP
II-7	住所 (国名)	日本国 JP
III-1	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-1-1	この欄に記載した者は	<del>米国のみ (US only)</del> <i>すべての指定国 (all designated states)</i> <span style="float: right;">*RO</span>
III-1-2	右の指定国についての出願人で ある。	
III-1-4ja	氏名(姓名)	岡崎 康司
III-1-4en	Name (LAST, First)	OKAZAKI, Yasushi
III-1-5ja	あて名:	247-0007 日本国 神奈川県 横浜市栄区 小菅ヶ谷3-41-16
III-1-5en	Address:	41-16, Kosugaya 3-chome Sakae-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 247-0007 Japan
III-1-6	国籍 (国名)	日本国 JP
III-1-7	住所 (国名)	日本国 JP

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本(出願用) - 印刷日時 2003年11月04日 (04.11.2003) 火曜日 14時58分36秒

III-2	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only) 全ての指定国 (all designated states) <sup>→ Ro</sup>
III-2-4j a	氏名(姓名)	阪倉 長平
III-2-4e n	Name (LAST, First)	SAKAKURA, Chouhei
III-2-5j a	あて名:	602-0855 日本国 京都府 京都市上京区河原町通荒神口東入る上生洲町 201-404
III-2-5e n	Address:	201-404, Kamiikesu-cho, Kawaramachi-dori kojinguchi higashiiru Kamigyo-ku, Kyoto-shi, Kyoto 602-0855 Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only) 全ての指定国 (all designated states) <sup>→ Ro</sup>
III-3-4j a	氏名(姓名)	山岸 久一
III-3-4e n	Name (LAST, First)	YAMAGISHI, Hisakazu
III-3-5j a	あて名:	520-0065 日本国 滋賀県 大津市 稲葉台3-6
III-3-5e n	Address:	3-6, Inabadai Otsu-shi, Shiga 520-0065 Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1ja	氏名(姓名)	奥山 尚一
IV-1-1en	Name (LAST, First)	OKUYAMA, Shoichi
IV-1-2ja	あて名:	107-0052 日本国 東京都 港区 赤坂三丁目2番12号 赤坂ノアビル8階
IV-1-2en	Address:	8th Floor, Akasaka NOA Bldg. 2-12, Akasaka 3-chome Minato-ku, Tokyo 107-0052 Japan
IV-1-3	電話番号	03-3584-7267
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-3588-1397
IV-1-5	電子メール	mail@okuyama.com
IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with same address as first named agent)
IV-2-1ja	氏名	有原 幸一; 松島 鉄男
IV-2-1en	Name(s)	ARIHARA, Koichi; MATSUSHIMA, Tetsuo

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

V	国の指定	
V-1	広域特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	--
V-2	国内特許 (他の種類の保護又は取扱いを 求める場合には括弧内に記載す る。)	US
V-6	指定の確認の宣言 出願人は、上記の指定に加えて 、規則4.9(b)の規定に基づき、 特許協力条約のもとで認められ る他の全ての国の指定を行う。 ただし、V-6欄に示した国の指 定を除く。出願人は、これらの 追加される指定が確認を条件と していること、並びに優先日か ら15月が経過する前にその確認 がなされない指定は、この期間 の経過時に、出願人によって取 り下げられたものとみなされる ことを宣言する。	
V-6	指定の確認から除かれる国	なし (NONE)
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主 張	
VI-1-1	出願日	2003年04月25日 (25.04.2003)
VI-1-2	出願番号	特願2003-121780
VI-1-3	国名	日本国 JP
VI-2	優先権証明書送付の請求 上記の先の出願のうち、右記の 番号のものについては、出願書 類の認証謄本を作成し国際事務 局へ送付することを、受理官庁 に対して請求している。	VI-1
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)
VIII	申立て	申立て数
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国 際出願日における出願人の資格 に関する申立て	-
VIII-4	発明者である旨の申立て（米国 を指定国とする場合）	-
VIII-5	不利にならない開示又は新規性 喪失の例外に関する申立て	4

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、  林崎 良英は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2002年11月04日（04.11.2002）
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	British Journal of Cancer
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

VIII-5-2	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、  岡崎 康司は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-2	開示の種類	刊行物
(i) VIII-5-2	開示の日付：	2002年11月04日（04.11.2002）
(ii) VIII-5-2	開示の名称：	British Journal of Cancer
(iii) VIII-5-2	開示の場所：	
(iv) VIII-5-2	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国
(v)		

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

VIII-5-3	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、  阪倉 長平は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-3 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-3 (ii)	開示の日付:	2002年11月04日（04.11.2002）
VIII-5-3 (iii)	開示の名称:	British Journal of Cancer
VIII-5-3 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-3 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国



## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

VIII-5-4	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、  山岸 久一は、 本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-4 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-4 (ii)	開示の日付：	2002年11月04日（04.11.2002）
VIII-5-4 (iii)	開示の名称：	British Journal of Cancer
VIII-5-4 (iv)	開示の場所：	
VIII-5-4 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。：	すべての指定国

## 特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

IX	照合欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書（申立てを含む）	9	-
IX-2	明細書（配列表を除く）	21	-
IX-3	請求の範囲	1	-
IX-4	要約	1	EZABST00.TXT
IX-5	図面	2	-
IX-7a	国際出願に含まれる用紙の枚数 （明細書の配列表を除く）	34	
IX-6	明細書の配列表	2	-
IX-7	合計	36	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-16	コンピュータ読み取り可能なヌ クレオチド又はアミノ酸配列表 ：		
IX-16 (i)	規則13の3に基づき提出する 国際調査のための写し（国際 出願の一部を構成しない）	-	1 フレキシ*ディスク
IX-17	PCT-EASYディスク	-	フレキシ*ディスク
IX-18	その他	国際調査のための写しの同 一性、又は左欄に記載した 配列表部分を含む写しの同 一性についての陳述書を添 付	-
IX-18	その他	磁気ディスクの記録形式等 の情報を記載した書面	-
IX-19	要約書とともに提示する図の番 号		
IX-20	国際出願の使用言語名：	日本語	
X-1	提出者の記名押印		
X-1-1	氏名(姓名)	奥山 尚一	

## 受理官庁記入欄

04.11.03

10-1	国際出願として提出された書類 の実際の受理の日	
10-2	図面：	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類 を補完する書類又は図面であっ てその後期間内に提出されたも のの実際の受理の日（訂正日）	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づ く必要な補完の期間内の受理の 日	
10-5	出願人により特定された国際調 査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際 調査機関に調査用写しを送付し ていない	✓

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年11月04日（04.11.2003）火曜日 14時58分36秒

## 国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	21 NOVEMBER 2003
------	-----------	------------------

胃癌由来の転移癌細胞の検出方法

5 技術分野

本発明は、胃癌由来の転移癌細胞の検出方法の検出方法、より詳細には、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼをマーカーとした、胃癌の腹膜播種又は腹腔内遊離癌細胞のような胃癌由来の転移癌細胞の検出方法に関する。

10 従来の技術

胃癌は、日本と東南アジアでは消化管で最も多くみられる悪性腫瘍であり、癌死亡率では、胃癌が世界で第2位を占めている(Parkin et al. 1999)。胃癌の予後は、診断技術や胃癌の治療法の発達により改善しているが、進行癌の治癒的切除の後に起こる再発の主原因は腹膜播種である。胃漿膜にまで浸潤した胃癌の予後は、

- 15 5年生存率が35%と低い(Yamazaki et al. 1989)。胃癌細胞のこのような悪性の特性のうちで、腹膜への転移は特に複雑な現象であり、多くのステップと多くの遺伝子が関与している。胃癌の腹膜播種には、接着分子、アポトーシス関連遺伝子および他の遺伝子が深く関与しているという報告があるが(Tahara et al., 1996, 2000; Yawata et al., 1998)、胃癌の転移のメカニズムの解明には、さらなる研究が必要である。癌の転移能に関係すると考えられている遺伝子発現の変化により、原発性腫瘍細胞の基底層からの脱出とアポトーシスへの耐性が高まることとがわかっているが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。

- 20 胃癌の腹膜播種のメカニズムを研究するために、Parkらは、原発病巣からSNU-1、SNU-5、SNU-16およびSNU-719、腹水から他の癌細胞株を樹立した(Park et al., 1990, 1994)。SNU細胞系は特に集中的に研究されている。例えば、SNU-16ではcMETが増幅され、SNU-1、SNU-

5 およびSNU-16ではTGF- $\beta$  2型受容体、CEA、CA19-9および  
c-erbB2の過剰発現が観察され、KATO-III細胞ではK-samが  
増幅され(Katoh et al., 1992)、GT3TKBではEカドヘリンの発現が減少する  
(Tamura et al., 1996)ことが確認されている。しかし、転移性胃癌細胞における

5 遺伝子の共通した変化は、まだ明らかにされていない。

癌転移には、複数の遺伝子が協同して関与することが知られているにもかかわらず、単一の遺伝子又は少数の遺伝子と転移との関連についてのみしか報告されていない。また、癌原発巣の転移能の相違は、発現された遺伝子の組み合わせが異なることに起因するものと考えられている。そのため、転移の程度および転移  
10 先の点で異なる転移能を有する胃癌細胞の遺伝子発現の解析は、胃癌腹膜播種のメカニズムの解明に重要である。

#### 発明の開示

胃癌の予後を改善するために、発明者らは、マイトマイシンC吸着微粒子活性炭(MMC-CH)腹腔内投与による漿膜浸潤陽性胃癌の再発予防を開発してい  
15 る。しかし、MMC-CHなどの腹腔内癌化学療法には、血小板減少、イレウス等の副作用があるため、胃癌細胞の腹腔内への転移可能性を確認し、腹腔内癌化学療法を適用すべきかどうか迅速に決定する必要がある。

消化器系の癌の診断には、一般的にCEA(癌胎児性抗原)がマーカーとして  
20 使用され、これを指標にした迅速定量RT-PCRを腹腔内遊離癌細胞の検出に使用することが国内では愛知癌センター等から提案されている。しかし、このマーカーは、上皮性の正常細胞や中皮細胞で弱く発現しているため、擬陽性と判断されるケースが多く、腹腔内の癌細胞の検出には難点がある。

そこで、本発明は、胃癌の腹膜播種又は腹腔内遊離癌細胞のような胃癌由来の  
25 転移癌細胞の検出のため、特異性の高い新規マーカーを同定することを目的とする。

胃癌が腹腔転移性であるかどうかを迅速に判断するための特異性の高いマーカー

ーを見つけるために、発明者らは、cDNAマイクロアレイを用いて、胃癌腹膜播種由来の細胞株であるSNU-5、SNU-16、SNU-719、KATO-IIIおよびGT3TKB細胞における約21000個の遺伝子の発現プロフィールを解析した。対照として、胃癌原発巣由来細胞株であるSNU-1を用いた。胃癌の腹膜播種に由来する細胞では特異的に高い発現を示すが、胃癌原発巣由来細胞では発現しないか極めて発現が弱い遺伝子を約20種同定した。

さらに、遺伝子の発現の変化とノザンブロッティング又はRT-PCRの解析とを組み合わせることにより、胃癌腹膜播種に由来する細胞に特異的な上記20種の遺伝子が、腹腔内の微小癌細胞の存在診断と術中迅速診断への応用が可能かどうかを検討した。その結果、CEAと同程度、あるいはそれ以上の感度および特異性を有する遺伝子を同定した。

発明者らは、胃癌原発巣細胞には発現しないが、胃癌腹膜播種に由来する細胞で特異的に発現する遺伝子として、アルデヒドデヒドロゲナーゼ (ALDH; aldehyde dehydrogenase) およびドーパデカルボキシラーゼ (DDC; dopa decarboxylase) を同定し、これらの遺伝子が、胃癌由来の転移癌細胞の検出マーカーとして使用できることを見出した。

したがって、本発明は、被験者から生体試料を採取するステップと、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方の存在を被験者の生体試料から検出するステップと、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方が存在する場合には、胃癌由来の転移癌細胞が前記試料中に含まれている可能性が高いと判断するステップとを含む胃癌由来の転移癌細胞の検出方法を提供する。

ここで、「アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼが存在する」とは、少なくともこれらの酵素をコードしている遺伝子がmRNAに転写されていることを意味し、もちろんこれらがタンパク質に翻訳されている場合も含むものとする。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはドーパデカルボキシラーゼ、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼとドーパデカルボキシラーゼの両方を腹膜播種のような胃癌由来の転移癌の検出マーカーとして使用することにより、高い検出感度で被検者の腹水、術中腹腔洗浄細胞等のような生体試料から胃癌の腹膜播種細胞を検出することが可能である。

アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの発現をそれらの mRNA の存在により確認することができる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの mRNA の存在の有無は、プライマー又はプローブを用いて確認できる。アルデヒドデヒドロゲナーゼの mRNA の存在を確認するためのプライマーとしては、配列番号 1 および 2 に記載のプライマー対を例示することができ、ドーパデカルボキシラーゼの mRNA の存在を確認するためのプライマーとしては、配列番号 3 および 4 に記載のプライマー対を例示することができる。アルデヒドデヒドロゲナーゼの mRNA の存在を確認するためのプローブとしては、配列番号 5 に記載のプローブを例示することができ、ドーパデカルボキシラーゼの mRNA の存在を確認するためのプローブとしては、配列番号 6 に記載のプローブを例示することができる。

別の方法として、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの存在を抗体を用いて検出することができる。

さらには、本発明は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの mRNA の存在を検出するためのプライマー、例えば、配列番号 1 および 2、又は配列番号 3 および 4 に記載の配列を有する一対のプライマーを提供する。本発明は、また、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの mRNA の存在を検出するためのプローブ、例えば、配列番号 5 又は 6 に記載の配列を有するプローブを提供する。またさらに、本発明は、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼを検出するための抗体を提供する。

これらのプライマー、プローブ若しくは抗体、又はそれらを含んでなる診断キ

ットを用いてアルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはドーパデカルボキシラーゼ、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼの両方をその mRNA レベル又はタンパク質レベルで検出することにより、被験者、特に胃癌患者の腹膜転移の有無を迅速かつ確実に検出することができ、腹腔内癌化学療法を適用すべきかの決定のための有力な材料が提供される。

被検者の生体試料としては、腹腔内に由来するものであれば特に限定されるものではなく、具体的には、被験者の腹膜のような腹腔の組織、腹水、術中腹腔洗浄中に含まれる細胞、腹腔内洗浄液（腹腔内洗浄に供された後に回収した洗浄液）等を例示できる。特に、腹水、術中腹腔洗浄細胞、腹腔内洗浄液が取得容易であるため好ましい。なお、本明細書では、原発性胃癌細胞に由来した腹腔内に転移した癌細胞を総称して、「転移癌細胞」と呼ぶ。転移癌細胞には、例えば、腹腔内遊離癌細胞、胃癌腹水癌細胞、及び腹膜播種などが含まれる。被験者は、患者、特に、癌患者、好ましくは胃癌の腹膜転移が疑われる患者をいう。

アルデヒドデヒドロゲナーゼは、細胞内外のアルデヒドからの細胞の防御機構に関連するタンパク質であるとして知られており、正常肝細胞や肝細胞癌での発現が報告されている (Canuto et al., 2001; Deichmann et al., 1999; Canuto et al., 2001)。また、ドーパデカルボキシラーゼは、別名芳香族 L-アミノ酸デカルボキシラーゼとも呼ばれ、腎臓、肝臓、脳など各組織に分布し、生理活性アミンの合成系、例えば神経伝達物質のドーパミンやセロトニンの合成に関連している。

ドーパデカルボキシラーゼは、神経芽細胞腫や肺小細胞癌において高い発現が報告されている (North et al., 1998; Gilbert et al., 1999)。アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼは、胃癌を除く他の癌での報告が散見されているが、胃癌での発現は報告されていない。また、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼについて、胃癌を含め、癌のマーカーに使用できるとい報告はない。

腹膜播種細胞又は胃癌腹水癌細胞を検出するために、本発明では、アルデヒド



デヒドロゲナーゼ若しくはドーパデカルボキシラーゼ、又はアルデヒドデヒドロゲナーゼとドーパデカルボキシラーゼをマーカーとして用いるが、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの検出は、mRNAのレベルでもタンパク質のレベルでも行なうことができる。

5 mRNAレベルの検出では、ノザンプロット法、RT-PCR法、TaqMan PCR法又はそれらの組み合わせなどの各種の方法を用いることができるが、これらの方法に特に限定されることなく任意の方法によりmRNAを定量的、定性的に測定することができる。例えば、アルデヒドデヒドロゲナーゼのmRNAをノザンプロットにより検出するためのプローブとしては、5' CACTGGC  
CCTGGTGGTAGAATACCCCATGGTGTGCAAATTCAA  
CAGCATTGTCCAAGTCGGCATCAGCTAACACAAT3'

(配列番号5) が、ドーパデカルボキシラーゼのmRNAをノザンプロットにより検出するためのプローブとしては、5' -AAGCACAGCCATCAGG  
ATTCAGGGCTTATCACTGACTACCGGCATTGGCAGA  
15 TACCACTGGGCAGAAGATTTCTGCTCTTTGAAAATGT  
GGTTTGTATTTAGGATGTATGGAGTCAAAGGACTGC  
AGGCTTATATCCGCAAGCATGTCCA-3' (配列番号6) がそれぞれ挙げられる。

mRNAの検出には、適当なプローブを用いて行なうことができる。ここで、  
20 本発明のプローブは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNA配列の一部と実質的に相補的な配列を有すればよく、プローブ配列の長さおよびmRNAのどの部位と実質的に相補的であるかなどは特に限定されない。ここで、実質的に相補的とは、プローブがアルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNAと特異的にハイブリッドできる程度に相  
25 補的であればよいことを意味する。さらに、これらのプローブは、5' 側又は3' 側、又はその両方に、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラー

ぜのmRNA配列と相補的ではない配列を含んでもmRNA配列と特異的にハイブリッドできる限り、本発明のプロープに含まれるものとする。例えば、検出しやすいように、任意の配列を付加したものを用いることができる。また、検出しやすいように5'末端を標識したものを用いることもでき、そのような標識としては、たとえば、ビオチン、蛍光、又は $^{32}\text{P}$ などが例示できる。

本発明のプライマーは、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNA又はcDNAのうち、上流および下流の配列の一部と実質的に相補的なプライマー対であればよく、プライマー配列の長さおよびmRNA又はcDNAのどの部位と実質的に相補的であるかなどは特に限定されない。ここで、実質的に相補的とは、mRNA又はcDNAとハイブリッドできる程度に相補的であればよいことを意味する。たとえば、これらのプライマーは、5'側又は3'側、又はその両方に、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNA又はcDNA配列と一部に相補的ではない配列を含んでも、これらとハイブリッドできる限り、本発明のプライマーに含まれるものとする。また、非特異的な増幅を防ぐためや、適当な制限酵素認識部位を導入するために、これらのmRNA又はcDNAと相補的でないミスマッチ配列を持つプライマーを使用することができる。

アルデヒドデヒドロゲナーゼの検出のためのプライマーの例として、配列番号1および2の配列を有するプライマー対、ドーパデカルボキシラーゼの検出のためのプライマーの例として、配列番号3および4の配列を有するプライマー対が挙げられる。

アルデヒドデヒドロゲナーゼの検出のためのプロープの例として、配列番号5の配列を有するプロープ、ドーパデカルボキシラーゼの検出のためのプロープの例として、配列番号6の配列を有するプロープが挙げられる。

タンパク質レベルの検出では、抗体を用いて検出することができ、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼに対するモノクローナル抗体、

ポリクローナル抗体、キメラ抗体、一本鎖抗体、又はそれらの抗原結合性の断片などを用いることができるが、特異性が高い点から、モノクローナル抗体がより好ましい。

上記各種の抗体は、当業者に公知の方法に基づいて作成できる。例えば、アル

- 5    デヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼ、又はそれらの一部のポリペプチドを抗原として用い、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、マウス、ラット、モルモット、ニワトリ等の動物に対して通常行われる免疫操作を実施してポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体を作成する。通常は、モノクローナル抗体の作成には、ミエローマと脾臓細胞とを融合してハイブリドーマを作成するハイブリドーマ法又はその各種の変法を用いることができる。

検出を容易にするために、抗体を標識することが好ましい。例えば、蛍光標識 (F I T C など)、フッ素クロム標識、酵素標識 (ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ ガラクトシダーゼ、フィコエリトリン など)、放射標識 (3 2 P、1 2 5 I など)、ビオチン標識、緑色蛍光タンパク質

15    (G F P)、金コロイド標識などによる標識が挙げられる。

タンパク質の検出では、ウェスタンブロット法、ドットブロット法、E L I S A、I D A T 法、S D S - P A G E、オクタロニー解析、免疫電気泳動、又はそれらの組み合わせなどの各種の方法を用いることができるが、これらの方法に特

20    に限定されることなく任意の方法によりタンパク質を定量的、定性的に測定することができる。

なお、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの存在を酵素活性の測定等により、検出することも可能である。

アルデヒドデヒドロゲナーゼまたはドーパデカルボキシラーゼの m R N A 又はタンパク質の検出は、当業者に公知の方法により行なうことができる (例

25    えば「新遺伝子工学ハンドブック」改定第 3 版、松村正實、山本雅編集、1 9 9 9 年 9 月 1 0 日、羊土社を参照)。

被験者の腹腔内播種の有無の判断には、被験者の生体試料中から、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNA又はタンパク質を検出する。必要に応じて、mRNAとタンパク質の両方のレベルを測定することによって腹膜転移が起こっているかどうかを判断するための材料としてもよい。

- 5 検出用キットは、プローブ、プライマー又は抗体のほか、採用する検出方法に応じて任意の試薬、緩衝液、容器等を含んでもよい。例えば、RT-PCR用には、逆転写酵素、緩衝液、dNTP、Taqポリメラーゼなどを含む。

本発明によれば、アルデヒドデヒドロゲナーゼ若しくはドーパデカルボキシラーゼ、又はその両者を、腹腔内の微小癌細胞の存在診断と術中迅速診断への応用が可能な、腹腔内遊離癌細胞の検出用のマーカーに用いることができる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼは、従来から検出用マーカーとして用いられているCEAと比べて、上皮性の正常細胞や中皮細胞で発現しないため、その発現を検出することにより、高い特異性および感度で腹腔内遊離癌を検出できる。アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの

15 発現の有無を調べることにより、被験者の腹腔内播種の有無を高い精度で検出して、その後の腹腔内癌化学療法を行なうかどうかの指針の一つとして用いることができる。

#### 図面の簡単な説明

- 図1は、原発巣と比べて、胃癌腹膜播種由来の細胞において発現量が増加した
- 20 遺伝子についてのノザンブロット解析の結果を示す。

図2は、原発巣と比べて、胃癌腹膜播種由来の細胞において発現量が減少した遺伝子についてのノザンブロット解析の結果を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

- 以下に実施例をあげて、本発明をさらに詳細に説明するが、これらにより本発
- 25 明を制限することを意図するものではない。

実施例1：腹水から得られた胃癌細胞系のcDNAのマイクロアレイによる遺伝

## 子発現解析

高密度 cDNA マイクロアレイを用いて、胃癌の腹膜播種に由来する細胞株および胃癌原発巣由来細胞株において 21168 個の遺伝子の発現を解析し、遺伝子発現プロフィールを比較した。

- 5 胃癌細胞株 SNU-1、SNU-5、SNU-16、SNU-719 は Park et al. により樹立された。KATO-III、および GT3TKB は理研細胞バンク (筑波、日本) より購入した。これらの細胞のうち、SNU-5、SNU-16、SNU-719、KATO-III および GT3TKB は、胃癌腹膜播種由来の細胞株であり、SNU-1 は胃癌原発巣由来細胞株である。GT3TKB は、一定の湿度に保ち、高グルコース DMEM (Sigma, St. Louis, MO) 中で、37℃で 5% の CO<sub>2</sub> 下で維持した。DMEM には、10% 牛胎児血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えた。80~90% の集密に達した後、冷 PBS で洗浄し、迅速にホモジナイズした。各細胞系から抽出した mRNA は、使用説明書に従い、FAST track キット Ver. 2 (Invitrogen) により精製した。
- 15 プローブの作成は次のように行なった。各細胞株から精製した mRNA のうち 1 μg を、ランダムプライム逆転写の間、Cy 3 を組み込むことにより標識した。各胃癌細胞株から得た cDNA は、Cy 5 で標識し、全組織について発現レファレンスとして使用した。正常胃粘膜の 30 サンプルの mRNA を、対照として使用した。標識は、400 ユニットの SuperScript II (GIBCO/BRL) ; 0.1 mM の
- 20 Cy 3-dUTP (又は Cy 5-dUTP) ; 0.5 mM の dATP、dCTP および dGTP 各々、0.2 mM の dTTP、10 mM の DTT、6 μl の 5× first-strand バッファーおよび 6 μg のランダムプライマーを含む全体積 30 μl 中において、42℃で 1 時間行った。不要なヌクレオチドを除くために、標識した cDNA を、500 μl の結合バッファー (0.03% ゼラチンおよび 20
- 25 g/μl の tRNA を含む、5M のグアニジンチオシアネート / 10 mM の Tris · HCl、pH 7.0 / 0.1 mM の EDTA) および 50 μl のシリカマ

トリクスバッファー (10%マトリクス/3.5Mグアニジン塩酸塩/20%グリセロール/0.1mMのEDTA/200mMのNaOAc、pH4.8~5.0)と混合し、GFXカラム(Amersham Pharmacia)に通して、Solvellの遠心分離機(RC-3B plus; H6000A/HBB6 ローター)を用いて15,000rpmで30分間遠心分離した。流出物を廃棄し、カラムを500μlの洗浄バッファーで洗浄した。吸着したプローブを最終容量17μlの蒸留水に溶出した。この標識プローブを、3μlのブロッキング溶液(10μg/μlのオリゴ(dA)、3μlの20μg/μl酵母tRNA、1μlの20μg/μlマウスCot1DNA、5.1μlの20×SSCおよび0.9μlの10%SDS)と混合した(Miki et al., 2001)。

アレイハイブリダイゼーションおよびデータ解析は、次のように行なった。標的を含む理研cDNAを、3つのマルチブロックからなる完全アレイ(各マルチブロックは10μlのハイブリダイゼーション溶液を要する)の最終容量30μl中でハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションの前に、プローブアリコートを95℃で1分間加熱し、その後室温に戻した。カバースリップを65℃でHybdcasette(ArrayIt.com から入手)においてハイブリダイズした。ハイブリダイゼーションの後、スライドを2×SSC/0.1%SDS中でカバースリップが外れるまで洗浄し、その後1×SSC中に移し、2分間穏やかに攪拌し、0.1×SSCで2分間洗浄した。洗浄後、スライドをSorvall 遠心分離機(RC-3B plus; H6000A/HBB6 ローター)により800rpmで遠心した。これらのスライドを、ScanArray5000 共焦点レーザーキャナーによりスキャンし、得られた画像をIMAGENE (BioDiscovery: Los Angeles)を用いて解析した。

データの正確さを高めるために、2回の別々の反応において同じRNAテンプレートに標識した、2回の実験を行った。データは、ゼロ以外であれば中央観測値(median observed value)を差し引き(ログスペース)することによりレファレンス標準と標準化した。再現可能なデータポイントのみを使用した。信頼度の低

いデータを除外するために、ソフトウェア解析の結果、胃癌腹膜播種由来の細胞株と胃癌原発巣由来細胞株の両細胞系に発現しないと判断された遺伝子を除いた。

- 5 発現した11680~15151個の遺伝子のなかで、44個の遺伝子が、対照であるSNU-1の発現の2倍の発現を示し、30個が他の細胞系の発現の半分以上の発現を示した。これらの結果を確認するために、ノザンブロット解析を行い、cDNAアレイに関して2倍以上の発現を示した全ての遺伝子を解析した。

ノザンブロットは、以前発明者らが報告した方法(Sakakura et al., 1994, 1996)により行った。簡単に説明すると、全細胞RNAをグアニジンイソチシアネートフェノールクロロホルム法により調整した。ポリ(A)+RNAの選択は、オリゴdTカラムにより行い、1%アガロース/2.2Mのホルムアルデヒドゲルにおいて分画した。プローブには、 $^{32}\text{P}$ でランダムプライムにより標識したものをを用いた。選択した各々の遺伝子と $\beta$ アクチンを、プローブとハイブリダイズさせた。各ブロットをBAS2000イメージアナライザーによりシグナル解析し、対照であるSNU-1と比較して過剰発現している度合いを計算した。

- 15 ノザンブロット解析による発現レベルにおける2倍以上の変化が有意であると考え、cDNAマイクロアレイ解析との整合性は55% (74個のうちの41個) であるが、27% (74個のうちの20個) は有意な変化を示さず、18% (74個のうちの13個) はcDNAマイクロアレイとは整合しない結果となった。マイクロアレイおよびノザンブロット解析により解析された遺伝子を、表1
- 20 と2にまとめた。

表 1 原発巣と比べて胃癌腹膜播種由来の細胞で発現量が増加した遺伝子

番号	遺伝子バンク (アクセッション番号)	ノザンプロット (平均値)	遺伝子チップ (平均値)	遺伝子名	機能
1	AA486275	3.2	3.63	白血球エラスターゼインヒビター	アポトーシス
2	AA446222	5.7	4.29	TGFβ誘導抗アポトーシス因子	アポトーシス
3	AA424695	2.3	2.14	インテグリンα3	細胞接着
4	AA444051	3.3	2.58	S100A10 (アネキシニン I のリガンド)	細胞接着
5	AA630328	4.3	6.02	ガレクチン3 (レクチン)	細胞接着
6	H94471	2.1	7.84	オクルディン	細胞接着
7	AA282906	6.5	9.58	CD44	細胞接着
8	R33456	7.3	15.89	デスモプラキニン (DPI, DPII)	細胞接着
9	H44051	6.5	10.48	ケラチン14	細胞接着、浸潤
10	AA598517	15.9	13.64	ケラチン8	細胞接着、浸潤
11	AA489569	10.3	25.63	ケラチン7	細胞接着、浸潤
12	R93124	15.3	24.08	アルドーケトレダクターゼファミリー1	薬物代謝
13	AA664101	14.7	33.13	アルデヒドデヒドロゲナーゼ	薬物代謝
14	N77779	2.5	5.78	腎腫瘍抗原RAGE1	免疫応答
15	AA424824	3.1	4.29	デストリン (アクチン脱重合因子)	細胞外基質との相互作用
16	AA625890	3.8	7.46	ミオシン6	細胞内オルガネラ輸送
17	AA425938	3.1	2.3	システインプロテアーゼ (レグマイン)	浸潤
18	H22826	4.1	5.66	LMO7	シグナル伝達
19	AA496691	5.1	6.19	ジストログリカン1	シグナル伝達
20	AA455369	4.2	2.55	ナトリウム/水素交換輸送体、イソフォーム1	シグナル伝達
21	AA281735	11.4	15.56	イノシトール三リン酸レセプター	シグナル伝達
22	AA412053	7.8	16.34	CD9	シグナル伝達 (修飾)
23	AA25319	3.1	2.27	カベオリン3	シグナル伝達又は進行
24	AA702640	7.6	11.08	ドーパドカルボキシラーゼ	シグナル伝達又は進行



表 2 原発巣と比べて胃癌腹膜播種由来の細胞で発現量が減少した遺伝子

番号	遺伝子バンク (アクセッション番号)	ノザンプロット (平均値)	遺伝子チップ (平均値)	遺伝子名	機能
1	AA453105	0.5	0.29	H2ヒストンファミリーメンバーL	アポトーシス
2	AA025275	0.3	0.35	細胞死関連タンパク質	アポトーシス
3	AA485668	0.3	0.37	インテグリンβ4	細胞接着
4	H37989	0.2	0.52	チューブリンβ-1鎖	細胞構造
5	T97593	0.2	0.37	hnRNP	細胞構造
6	T64150	0.4	0.46	RAD51ホモログC	染色体維持
7	H79047	0.3	0.16	IGFBP2	増殖および代謝
8	N75745	0.2	0.09	IL2レセプターγ	免疫応答
9	AA476285	0.2	0.37	CD4	免疫応答
10	T72202	0.3	0.46	IL4stat	免疫応答
11	AA236617	0.4	0.37	PIXα	シグナル伝達
12	AA630082	0.1	0.41	p27kip	シグナル伝達
13	AA629692	0.3	0.46	TCP1含有シャペロニン	シグナル伝達
14	W46769	0.2	0.61	ヒストンデアセチラーゼ	シグナル伝達
15	AA485214	0.2	0.22	ヌクレオバインディング	シグナル伝達
16	W86653	0.1	0.11	FKBP54	シグナル伝達
17	H96140	0.2	0.43	アシル-CoAゼンザイムAデヒドロゲナーゼ	シグナル伝達

## 実施例 2 : 8 個の胃癌細胞系における選択された遺伝子の発現

他の胃癌細胞系について腹膜播種能はこれまでの報告にいくつかまとめられているので、実施例 1 で調べた 6 個の細胞株に加えて他の 2 つの胃癌細胞株 MKN 7 と NUGC-3 を用いて、SNU-1 と他の胃癌細胞系との間で発現に差を生  
5 じる遺伝子が胃癌細胞株の腹膜播種能に相関関係があるかどうかをノザンブロット解析により調べた。KATO-III、SNU-5、SNU-16 および SNU-719 の 4 種の細胞株が、高い播種能を有することを知られているため、ヌードマウスを用いた腹膜播種モデルとしてこれらの細胞株を使用した。MKN 7 は理研細胞バンク（筑波、日本）より購入した。NUGC-3 細胞は、ヒューマンサイエンス研究資源バンク（大阪、日本）から購入した。MKN 7 および NUGC-3 を 10% 牛胎児血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを加えた RPMI 1640 (Sigma) 中で維持した。他の胃癌細胞系は、実施例 1 に記載のと  
10 おり培養した。MKN 7 および NUGC-3 は、動物実験により接種後 4 週間後でも腹膜転移を生じないことを確認した。ヌードマウスにおける GT3TKB の播種能については、報告がない。

ノザンブロット解析は、実施例 1 に記載のとおりに行なった。典型的なデータを図 1 と図 2 にまとめた。図 1 および図 2 は、8 種の胃癌細胞における異なる発現を示す遺伝子のノザンブロット解析である。図 1 は、原発巣と比べて、胃癌腹  
20 膜播種由来の細胞において発現量が増加した遺伝子を示す。図 2 は、原発巣と比べて、胃癌腹膜播種由来の細胞において発現量が減少した遺伝子を示す。

これらの結果から、細胞は、次の 3 つのグループに分類できることが明らかになった。(a) 腹膜播種についての高いポテンシャルを有する細胞株 SNU-5、SNU-16、SNU-719、KATO-III および GT3TKB、(b) 播種についてのポテンシャルがない腫瘍由来細胞系である SNU-1、(c) 播種について低いポテンシャルしか有さないか、ポテンシャルがない MKN 7 および NUGC-3。

多くの遺伝子、例えばCD44およびケラチンファミリー遺伝子が腹膜播種由来の胃癌細胞に強く発現された。アルデヒドデヒドロゲナーゼやIP3Rのような遺伝子は、播種について高いポテンシャルがある細胞のみにおいて高レベルで発現するが、播種について低いポテンシャルを有する細胞では、低レベルの発現を示すか、ほとんど発現されなかった。これらの遺伝子における発現量の変化は、胃癌腹膜播種について特異的であると考えられる。p27のよう発現量が減少した遺伝子の多くは、他の全ての胃癌細胞系で抑制されたが、IL4Statのようないくつかの遺伝子は、腹膜播種の胃癌細胞において集中的に発現量が減少した。

### 10 実施例3：臨床検体におけるアルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼのRT-PCR

実施例1および実施例2の結果から、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼは、原発性胃癌細胞では発現されないか又は極めて発現量が低い、胃癌腹膜播種由来の細胞では発現量が増加するため、これらの発現を調べることによって、腹腔内の微小癌細胞の存在診断に使用できると考えられた。これらの遺伝子の発現を腹腔内微小癌細胞の存在診断に適用できるかどうかを確かめるため、京都府立医大消化器外科における胃癌手術症例のうち、胃癌癌性腹膜炎患者12例、非癌患者21例をそれぞれポジティブコントロール、ネガティブコントロールとし、実際に腹膜転移しているかどうか不明である漿膜浸潤陽性胃癌患者18例において、アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼの発現をRT-PCRにより確認した。

胃癌癌性腹膜炎患者から穿刺吸引した癌性腹水、非癌患者および漿膜浸潤陽性胃癌患者の術中腹腔洗浄水中に含まれる細胞を遠心により集め、AGPC変法によってRNAを抽出後、アルデヒドデヒドロゲナーゼには、配列番号7のセンスプライマー5'-ATTGTGTTAGCTGATGCCGACTT-3' (配列番号7) および配列番号8のアンチセンスプライマー5'-CACTGGCCC

TGGTGGTAGAATA-3' (配列番号8) を、ドーパデカルボキシラーゼ  
 には、配列番号9のセンスプライマー5' -AAGCACAGCCATCAGG  
 ATTCA-3' (配列番号9) および配列番号10のアンチセンスプライマー5'  
 -TGGACATGCTTGCGGATATAAG-3' (配列番号10) をそれ  
 5 それ用いて、cDNAを合成した。これらのcDNAを鋳型として、Gene a  
 mp 5700を使用して定量的RT-PCRを行なった。PCRは、アルデヒド  
 デヒドロゲナーゼには配列番号1のセンスプライマー5' -ATTGTGTTA  
 GCTGATG CCGACTT-3' および配列番号2のアンチセンスプライ  
 マー5' -CACTGGCCCTGGTGGTAGAATA-3' を、ドーパデ  
 10 カルボキシラーゼには配列番号3のセンスプライマー5' -AAGCACAGC  
 CATCAGGATTCADDC-AS1217 および配列番号4のアンチセン  
 スプライマー5' -TGGACATGCTTGCGGATATAAG-3' をそ  
 れぞれ用いた。

アルデヒドデヒドロゲナーゼおよびドーパデカルボキシラーゼのRT-PCR  
 15 の結果は、以下のとおりである。

	アルデヒドデヒドロゲナーゼ	ドーパデカルボキシラーゼ
特異性	12/12(100%)	12/12(100%)
感度	19/21(95%)	19/21(95%)
漿膜浸潤陽性胃癌患者	12/18(67%)	16/18(67%)

表中、特異性は、胃癌癌性腹膜炎患者12例のうちのアルデヒドデヒドロゲナ  
 ーゼ又はドーパデカルボキシラーゼが検出された例数を示し、感度は、非癌患者  
 20 21例のうちのアルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼが検  
 出されなかった例数を示す。漿膜浸潤陽性胃癌患者については、18例のうち、  
 アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼが検出された例数で

ある。

漿膜浸潤陽性胃癌患者は、その後の再発を確認されていないが、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼが検出された患者は、腹腔内に転移した可能性が極めて高いと推測される。

#### 5 実施例4：アルデヒドデヒドロゲナーゼの感度検定

中皮細胞培養株又は健常者の抹消血リンパ球と胃癌細胞株SNU-5を混合してRT-PCRによりアルデヒドデヒドロゲナーゼの感度検定を行なった。また、正常細胞と胃癌細胞株SNU-5を混合してCEAの感度検定を行い比較した。アルデヒドデヒドロゲナーゼの感度検定に用いたプライマーおよびRT-PCRの条件は実施例3とほぼ同じである。アルデヒドデヒドロゲナーゼの感度検定では、正常リンパ球 $1 \times 10^4 \sim 5$ 個中1個の癌細胞を検出でき、中皮細胞培養株 $1 \times 10^4 \sim 5$ 個中1個の癌細胞を検出できた。CEAを用いた場合、検出感度は、正常細胞 $1 \times 10^4 \sim 5$ 個の癌細胞を検出可能であるが、CEAは中皮細胞では弱く発現しているため、中皮細胞中での検出感度はかなり低下する。したがって、

15 アルデヒドデヒドロゲナーゼは、CEAに比べて高感度であるといえる。

この出願に関連する先行技術文献情報としては次のものがある。

1. Canuto RA, Ferro M, Salvo RA, Bassi AM, Trombetta A, Maggiora M, Martinasso G, Lindahl R and Muzio G. (2001) Increase in class 2 aldehyde dehydrogenase expression by arachidonic acid in rat hepatoma cells. *Biochem J*, 357:811-8.
2. Deichmann M, Benner A, Bock M, Jackel A, Uhl K, Waldmann V and Naher H. (1999) S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol*, 17:1891-6.
3. Gilbert J, Haber M, Bordow SB, Marshall GM and Norris MD. (1999) Use of tumor-specific gene expression for the differential diagnosis of neuroblastoma from other pediatric small round-cell malignancies. *Am J Pathol*, 155:17-21.
4. Katoh M, Hattori Y, Sasaki H, Tanaka M, Sugano K, Yazaki Y, Sugimura T and Terada M (1992) K-sam gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89:2960-4.
5. Miki R, Kadota K, Bono H, Mizuno Y, Tomaru Y, Carninci P, Itoh M, Shibata K, Kawai J, Konno H, Watanabe S, Sato K, Tokusumi Y, Kikuchi N, Ishii Y, Hamaguchi Y, Nishizuka I, Goto H, Nitanda H, Satomi S, Yoshiki A, Kusakabe M, DeRisi JL, Eisen MB, Iyer VR, Brown PO, Muramatsu M, Shimada H, Okazaki Y and Hayashizaki Y. (2000) Delineating developmental and metabolic pathways in vivo by expression profiling using the RIKEN set of 18,816 full-length enriched mouse cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci USA*; 98:2199-204.
6. North WG and Du J. (1998) Key peptide processing enzymes are expressed

by a variant form of small-cell carcinoma of the lung. *Peptides* 19:1743-7.

7. Park JG, Frucht H, LaRocca RV, Bliss DP Jr, Kurita Y, Chen TR, Henslee JG, Trepel JB, Jensen RT, Johnson BE, et al. (1990) Characteristics of cell lines established from human gastric carcinoma. *Cancer Res*, 50:2773-80.

5 8. Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB and Sporn MB. (1994) Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:8772-6.

10 9. Parkin, D.M., Pisani, P and Ferlay, J. (1999). Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 80, 827-841.

10 10. Sakakura C, Ymaguchi-Iwai Y, Satake M, Bae SC, Takahashi A, Ogawa E, Hagiwara A, Takahashi T, Murakami A, Makino K, Nakagawa A T, Kamada N and Ito Y (1994) Growth inhibition and induction of differentiation of t(8;21) acute myeloid leukemia cells by the DNA-binding domain of PEBP2 and the AML1/MTG8(ETO)-specific antisense oligonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11723-11727.

20 11. Sakakura C, Sweeney EA, Shirahama T, Igarashi Y, Hakomori S, Nakatani H, Tsujimoto H, Imanishi T, Ohgaki H M, Ohyama T, Yamazaki J and Hagiwara A, Yamaguchi T, Sawai K and Takahashi T (1996) Overexpression of bax sensitizes human breast cancer MCF-7 cells to radiation-induced apoptosis. *Int J Cancer*; 67:101-105.

25 12. Tahara E (2000) Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer *Verh Dtsch Ges Patol*, 84, 43-9.

13. Tahara E, Semba S and Tahara H (1996) Molecular biological

observations in gastric cancer. *Semin Oncol* 23:307-15.

1 4 . Tamura G, Sakata K, Nishizuka 5, Maesawa C, Suzuki Y, Iwaya T, Terashima M, Saito K and Satodate R. (1996) Inactivation of the E-cadherin gene in primary gastric carcinomas and gastric carcinoma cell lines. *Jpn J*

5 *Cancer Res.*87:1153-9.

1 5 . Yamazaki H, Oshima A, Murakami R, Endoh S and Ubukata T. A long-term follow-up study of patients with gastric cancer detected by mass screening. *Cancer*. 1989;63:613-7.

1 6 . Yawata A, Adachi M, Okuda H, Naishiro Y, Takamura T, Hareyama M, Takayama S, Reed JC. and Imai K. (1998) Prolonged cell survival enhances peritoneal dissemination of gastric cancer cells. *Oncogene*6, 2681-2686.



## 請求の範囲

1. 被験者から生体試料を採取するステップと、

アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方

5 の存在を被検者の生体試料から検出するステップと、

アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方

が存在する場合には、胃癌由来の転移癌細胞が前記試料中に含まれている可能性  
が高いと判断するステップと

を含む胃癌由来の転移癌細胞の検出方法。

2. アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの存在を、ア  
ルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNAの存在によ  
り確認することを特徴とする請求項1の転移癌細胞の検出方法。

3. アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの存在を抗体  
により検出することを特徴とする請求項1に記載の転移癌細胞の検出方法。

15 4. アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼのmRNAの  
存在を検出するためのプライマー対又はプローブを含んでなる胃癌由来の転移癌  
細胞の診断キット。

5. アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼを検出するた  
めの抗体を含んでなる胃癌由来の転移癌細胞の診断キット。

## 要約書

- 被験者から生体試料を採取するステップと、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方の存在を被験者の生体試料から検出
- 5 するステップと、アルデヒドデヒドロゲナーゼ又はドーパデカルボキシラーゼの少なくとも一方が存在する場合には、胃癌由来の転移癌細胞が前記試料中に含まれている可能性が高いと判断するステップとを含む方法により、胃癌由来の転移癌細胞を検出する。これらを胃癌由来の転移癌細胞のマーカーとして使用することによって、胃癌患者の腹膜転移の有無を迅速かつ確実に検出することができ、
- 10 腹腔内癌化学療法を適用すべきかの決定のための有力な材料が提供される。